

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

BRUNO NUNES LIMA

**FOSFOLIPASE DE *Bothrops alternatus*: PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE  
POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

UBERLÂNDIA  
2025

BRUNO NUNES LIMA

FOSFOLIPASE DE *Bothrops alternatus*: PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE  
POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biologia da Universidade  
Federal de Uberlândia como requisito parcial  
para a obtenção do título de Licenciado em  
Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Cristine Neves  
Mamede (ICBIM)

Coorientadora: Profa. Dra. Lizandra Ferreira de  
Almeida e Borges (ICBIM)

UBERLÂNDIA

2025

BRUNO NUNES LIMA

FOSFOLIPASE DE *Bothrops alternatus*: PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE  
POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biologia da Universidade  
Federal de Uberlândia como requisito parcial  
para a obtenção do título de Licenciado em  
Biologia.

Uberlândia, 12 de setembro de 2025.

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Carla Cristine Neves Mamede – Universidade Federal de Uberlândia.

---

Profa. Dra. Carine Firmino Carvalho Roel – Universidade Federal de Uberlândia.

---

Profa. Dra. Helisângela de Almeida Silva – Universidade Federal de Uberlândia.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Wilson e Sirlene, pelo apoio incondicional e incentivo constante aos estudos, por proporcionarem o ambiente ideal para minha dedicação acadêmica, por estarem presentes nas decisões importantes e por seus conselhos sempre oportunos.

Ao meu irmão, Wilson Jr, por ter me apresentado ao curso de Ciências Biológicas e por me acompanhar durante toda a jornada acadêmica.

À minha companheira de curso e laboratório, Ana Laura, pelo auxílio tanto nas questões relacionadas à pesquisa quanto no apoio pessoal.

À minha orientadora, Carla Cristine Neves Mamede, pela oportunidade de realizar este projeto, pelo ensino dos conhecimentos laboratoriais essenciais e pela orientação dedicada ao longo de toda a pesquisa.

À minha coorientadora, Lizandra Ferreira de Almeida e Borges, por ter aberto as portas do laboratório para a realização deste trabalho, pelas valiosas conversas e conselhos durante o planejamento e desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos, que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha trajetória universitária.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento que tornou este projeto viável.

À Universidade Federal de Uberlândia, por oferecer as oportunidades que possibilitaram minha formação, crescimento pessoal e profissional.

*“Nenhum problema pode ser resolvido pelo  
mesmo estado de consciência que o criou.”*

*- Albert Einstein*

## RESUMO

**Introdução:** A crescente resistência bacteriana aos antibióticos convencionais é um problema de saúde pública, em razão das taxas elevadas de resistência dos microrganismos. Esse cenário reforça a necessidade de novas fontes de agentes antimicrobianos. As peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* são misturas complexas de moléculas bioativas, incluindo enzimas como fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) com potencial atividade terapêutica. Essas enzimas destacam-se por sua ação sobre fosfolipídios de membranas celulares e por apresentar atividade biológica relevante, incluindo potencial antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Materiais e Métodos:** A peçonha bruta de *B. alternatus* foi submetida a fracionamento cromatográfico sequencial (troca iônica, exclusão molecular e interação hidrofóbica) para purificação de fosfolipases. As frações foram analisadas quanto ao perfil proteico por SDS-PAGE, atividade fosfolipásica em gel de agarose emulsificado com gema de ovo e efeito antibacteriano frente a cepas padrão de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, por método de disco-difusão. **Resultados:** O fracionamento da peçonha de *B. alternatus* resultou na obtenção de uma fosfolipase com massa molecular aproximada de 17 KDa e aproveitamento de 70% na última etapa cromatográfica. A fosfolipase isolada manteve atividade enzimática, mas não apresentou atividade antibacteriana contra as cepas testadas. Entretanto, foi possível identificar na fração A5B2 a presença de toxinas com potencial antibacteriano contra *S. aureus*. **Conclusão:** Os métodos aplicados nesse trabalho foram eficientes para isolar da peçonha de *B. alternatus* uma fosfolipase com ação enzimática preservada. Embora a enzima isolada não tenha apresentado atividade antibacteriana, observou-se potencial antimicrobiano em frações intermediárias da peçonha, o que indica a possível participação de outras proteínas ou a ação sinérgica entre diferentes componentes. Esses resultados reforçam a relevância do estudo e apontam para a necessidade de investigações adicionais voltadas à caracterização estrutural e à avaliação terapêutica das toxinas ofídicas.

Palavras-chave: Serpentes; Urutu; Peçonha ofídica; Proteínas bioativas; Resistência bacteriana.

## ABSTRACT

**Introduction:** The increasing bacterial resistance to conventional antibiotics is a public health concern due to the high resistance rates of microorganisms. This scenario highlights the need for new sources of antimicrobial agents. Snake venoms from the genus *Bothrops* are complex mixtures of bioactive molecules, including enzymes such as phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) with potential therapeutic activity. These enzymes stand out for their action on membrane phospholipids and for their relevant biological activity, including antimicrobial potential against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

**Materials and Methods:** Crude venom from *B. alternatus* was subjected to sequential chromatographic fractionation (ion exchange, molecular exclusion, and hydrophobic interaction) for the purification of phospholipases. The fractions were analyzed for protein profile by SDS-PAGE, phospholipase activity in agarose gel emulsified with egg yolk, and antibacterial effect against reference strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*, using disk diffusion method. **Results:** Fractionation of *B. alternatus* venom yielded a phospholipase with an approximate molecular mass of 17 kDa and 70% recovery in the final chromatographic step. The isolated phospholipase retained enzymatic activity but did not show antibacterial activity against the tested strains. However, antibacterial potential against *S. aureus* was identified in fraction A5B2. **Conclusion:** The methods applied in this study were effective in isolating from *B. alternatus* venom a phospholipase with preserved enzymatic activity. Although the isolated enzyme did not display antibacterial activity, antimicrobial potential was observed in intermediate fractions of the venom, suggesting the possible involvement of other proteins or synergistic action between different components. These findings reinforce the relevance of this research and indicate the need for further investigations focused on the structural characterization and therapeutic evaluation of snake venom toxins.

**Keywords:** Snakes; Urutu; Snake venom; Bioactive proteins; Bacterial resistance.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral .....	11
2.2 Objetivos Específicos .....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1 Purificação de PLA <sub>2</sub> s de <i>B. alternatus</i> .....	11
3.2 Caracterização Bioquímica e Funcional .....	13
3.2.1 Determinação da Concentração Proteica .....	13
3.2.2 Identificação da Massa Molecular das Proteínas.....	13
3.2.3 Ensaio de Atividade Fosfolipásica.....	13
3.2.4 Atividade Antibacteriana .....	14
4. RESULTADOS.....	14
4.1 Purificação de PLA <sub>2</sub> s de <i>B. alternatus</i> .....	14
4.2. Caracterização bioquímica e funcional.....	16
5. DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÃO.....	21
7. REFERÊNCIAS .....	21

## 1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos convencionais constitui um dos maiores desafios da saúde pública mundial. A resistência antimicrobiana (RAM) é considerada uma das principais ameaças globais à saúde e ao desenvolvimento, sendo responsável por impactos significativos na morbidade, mortalidade e nos custos hospitalares. Estima-se que a RAM bacteriana tenha sido diretamente responsável por 1,27 milhão de mortes em todo o mundo em 2019 e tenha contribuído para 4,95 milhões de mortes, evidenciando a gravidade do problema (WHO, 2023; Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).

Entre os microrganismos de maior impacto clínico destacam-se as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, frequentemente envolvidos em infecções hospitalares e comunitárias e apresentando taxas alarmantes de resistência. O Relatório do sistema global de vigilância de resistência e uso de antimicrobianos (GLASS) de 2022 relatou que, em 76 países, 42% das cepas de *E. coli* apresentaram resistência a antibióticos atuais, enquanto 35% das cepas de *S. aureus* apresentaram resistência similar. *P. aeruginosa*, especialmente em Unidades de Terapia Intensiva, está associada a pneumonias ventilatórias, infecções de corrente sanguínea e surtos hospitalares, sendo capaz de desenvolver resistência rapidamente a diversos antimicrobianos, o que torna o manejo terapêutico complexo e aumenta o risco de mortalidade (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022; Silva et al., 2021; WHO, 2023)

A resistência observada nesses patógenos está intimamente relacionada à estrutura de suas paredes celulares: *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, ou seja, possui uma parede espessa de peptidoglicano que atua como barreira protetora contra agentes externos. Já as bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa*, têm parede celular mais fina, mas envolvida por uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos que dificulta a penetração de antibióticos (Alterthum; Rácz, 2015; Mayer et al., 2019; Salton, 1953).

Considerando a crescente resistência bacteriana aos antibióticos convencionais, a busca por novas fontes de agentes antimicrobianos é de extrema importância. O mundo enfrenta uma crise no desenvolvimento de novos antibióticos, já que a introdução de moléculas eficazes não acompanha a velocidade com que surgem bactérias resistentes, o que evidencia a urgência em explorar novas estratégias terapêuticas (Antimicrobial

Resistance Collaborators, 2022; WHO, 2023). Um número crescente de infecções está se tornando mais difícil de tratar, pois os antibióticos tradicionalmente empregados perdem eficácia, fenômeno frequentemente associado ao uso moderado e irregular desses medicamentos (Jernigan et al., 2020). Nesse contexto, os produtos naturais despontam como alternativas promissoras. Eles oferecem vantagens relevantes no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, como a ampla diversidade estrutural e funcional de seus constituintes, muitas vezes superior à de coleções sintéticas (Strohl, 2000).

Entre esses produtos, um exemplo clássico do aproveitamento de substâncias naturais na medicina é o Captopril®, desenvolvido em 1975 e utilizado até hoje no tratamento de hipertensão. Originado a partir de um peptídeo derivado da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*, o Captopril® foi o primeiro medicamento derivado de peçonhas de serpentes a chegar ao mercado farmacêutico e a ser incorporado à prática clínica. E, hoje, representa um marco no uso de toxinas como modelos para o desenvolvimento de novas terapias (Valario, 2024).

Desde então, as peçonhas ofídicas têm sido investigadas como fontes promissoras de biomoléculas com potencial terapêutico. Entre os compostos bioativos presentes, destacam-se metaloproteases (SVMPs), serinoproteases (SVSPs), fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e L-aminoácido oxidases (LAAOs), desintegrina, lectinas do tipo-C e peptídeos; todos associados à diferentes efeitos biológicos, como citotoxicidade, miotoxicidade e modulação de processos fisiológicos. Dentre essas proteínas, as PLA<sub>2</sub> têm recebido atenção especial por sua capacidade de atuar contra linhagens bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas (Chippaux et al., 1991; Corrêa et al., 2016; Samy et al., 2014; Santos et al., 2023; Tasoulis et al., 2017). A ação das PLA<sub>2</sub> envolve a hidrólise de fosfolipídios das membranas celulares, liberando ácidos graxos e lisofosfatídeos, o que compromete a integridade da membrana e desencadeia efeitos citotóxicos, permitindo sua aplicação como agentes antibacterianos (Costa et al., 2008; Arni; Ward, 1996; Moura-da-Silva et al., 1991; Corrêa et al., 2016).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo a purificação das toxinas da peçonha de *Bothrops alternatus* e a avaliação de seu potencial antimicrobiano frente a bactérias de importância clínica. A serpente *B. alternatus*, popularmente conhecida como Urutu-Cruzeiro, apresenta destaque devido à sua ampla distribuição geográfica e à complexidade da composição proteica de sua peçonha (Campbell & Lamar, 1989; Rocha & Furtado, 2005). SVMPs, SVSPs, PLA<sub>2</sub> e LAAOs são abundantes na peçonha e

desencadeiam efeitos biológicos variados e relevantes para a prospecção de novos agentes terapêuticos (Ohler et al., 2010).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar, isolar e caracterizar toxinas ofídicas com atividade antibacteriana.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Identificar e purificar enzimas fosfolipases A<sub>2</sub> presentes na peçonha da serpente *B. alternatus*.
2. Caracterizar as fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas quanto à sua atividade enzimática e potencial antibacteriano.

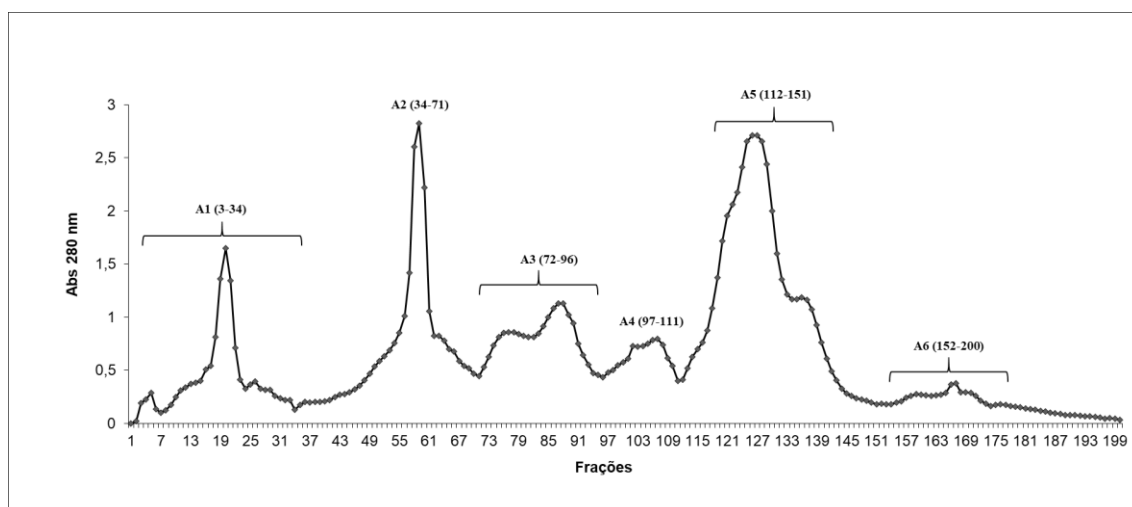
## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Purificação de PLA<sub>2</sub>s de *B. alternatus***

Neste trabalho, utilizou-se a fração A5 obtida através da peçonha bruta cristalizada de *B. alternatus* (574 mg), proveniente do Serpentário de Batatais/SP (lote 2009), gentilmente cedida por Funagoshi. A peçonha bruta, foi solubilizada em tampão bicarbonato de amônio (AMBIC 0,05 M, pH 7,8), centrifugada a  $10.000 \times g$  por 10 minutos, e o sobrenadante resultante aplicado em coluna de cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel) (Funagoshi 2024).

O fracionamento inicial da peçonha bruta resultou na obtenção das frações A1–A6 (Fig. 1) (Funagoshi 2024). A fração A5 apresentou maior relevância devido à sua composição proteica e perfil enzimático. Esta foi submetida a uma nova etapa cromatográfica visando refinar a separação das proteínas de acordo com seus tamanhos moleculares aparentes. Para isso, cerca de 146 mg da fração A5 foram aplicados em cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephadex G-75 (2,0 × 100 cm). O processo foi conduzido em temperatura ambiente, com eluição em tampão AMBIC (0,05 M, pH 7,8) a fluxo constante de 20 mL/h e coleta de frações de 3 mL. As amostras obtidas foram analisadas quanto à composição proteica e às atividades enzimática e antibacteriana, sendo que a fração de interesse foi selecionada para nova etapa

cromatográfica de refinamento. As frações foram analisadas quanto à absorbância (Abs) em UV (280 nm).



**Figura 1 – Fracionamento da peçonha de *B. alternatus* em cromatografia de troca iônica.** A peçonha bruta de *B. alternatus* (574 mg) foi aplicada em cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel), eluída em gradiente crescente de AMBIC (0,05 M – 1 M), a um fluxo de 20mL/hora e foram coletadas frações de 3 mL. As frações foram analisadas quanto à absorbância (Abs) em UV (280 nm), reunidas em 6 picos principais, denominados como A1 a A6. Fonte: Funagoshi (2024).

Na sequência, com o objetivo de separar seus constituintes com base nas interações hidrofóbicas entre as proteínas presentes e a fase estacionária, a amostra contendo PLA<sub>2</sub>s com ação enzimática e potencial antimicrobiano foi submetida à cromatografia de interação hidrofóbica utilizando coluna pré-empacotada Phenyl HP (1 mL) acoplada a um sistema de cromatografia líquida de rápida performance (FPLC – ÄKTA Purifier). A eluição ocorreu em gradiente decrescente de NaCl (4,0–0 M) diluído em tampão Tris-HCl (0,01 M, pH 8,5), sob fluxo de 0,5 mL/min, com coleta de frações de 1 mL, conforme protocolo previamente descrito por Dias e col. (2018), com modificações. As frações foram analisadas quanto à absorbância (Abs) em UV (280 nm).

As etapas cromatográficas foram analisadas considerando a quantidade de proteína aplicada em cada coluna e a quantidade recuperada da proteína alvo. O percentual de aproveitamento foi calculado pela seguinte relação:  $\text{Aproveitamento (\%)} = (\text{quantidade de proteína alvo recuperada} \div \text{quantidade de proteína aplicada}) \times 100$ .

## **3.2 Caracterização Bioquímica e Funcional**

### **3.2.1 Determinação da Concentração Proteica**

A concentração de proteínas nas amostras coletadas durante as etapas cromatográficas foi determinada por meio da absorbância no ultravioleta ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ), explorando a absorção característica dos resíduos aromáticos presentes nas proteínas (Layne, 1957). As análises foram conduzidas utilizando um espectrofotômetro BioSpec-Mini (Shimadzu Biotech), disponível no Laboratório de Biofísica da Universidade Federal de Uberlândia. O tampão usado nas cromatografias serviu como branco para correção do fundo espectral.

### **3.2.2 Identificação da Massa Molecular das Proteínas**

A estimativa da massa molecular das toxinas isoladas foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com concentração de 12–14% (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970), sob condições desnaturantes, em ensaios com e sem agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol). Para a determinação da massa molecular das toxinas, utilizou-se um marcador de massa molecular composto por fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa). Os géis foram corados com corante azul de Coomassie para visualização das bandas proteicas. A massa molecular das toxinas foi estimada por comparação da migração relativa das bandas das amostras com as do marcador.

### **3.2.3 Ensaio de Atividade Fosfolipásica**

As amostras resultantes das etapas cromatográficas foram submetidas a um ensaio de atividade fosfolipásica em gel de agarose emulsificado com gema de ovo de galinha, conforme descrito em Dias e col. (2018), com modificações. A preparação do gel envolveu a utilização de uma solução de agarose a 1% em tampão fosfato de sódio (PBS), enriquecida com cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), gema de ovo (20 mL) e azida sódica a 0,005%. Essa mistura foi vertida em uma placa de vidro com moldes para a formação de 20 poços destinados à aplicação das amostras. Cada poço recebeu 50  $\mu\text{L}$  de amostra com concentração padronizada de proteína (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Após a solidificação do gel, as amostras foram aplicadas nos poços, incubadas à temperatura ambiente e monitoradas nos períodos de 24 e 48 horas. A formação de halos translúcidos ao redor dos poços foi usada para

identificação da atividade fosfolipásica das amostras testadas. Controles negativo (PBS) e positivo (peçonha bruta) foram utilizados para a comparação dos resultados.

### 3.2.4 Atividade Antibacteriana

A análise da atividade antibacteriana foi realizada em triplicata, frações da toxina pura e frações contendo as proteínas isoladas dessa toxina foram utilizadas para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), também conhecido como antibiograma, utilizando a técnica de disco difusão.

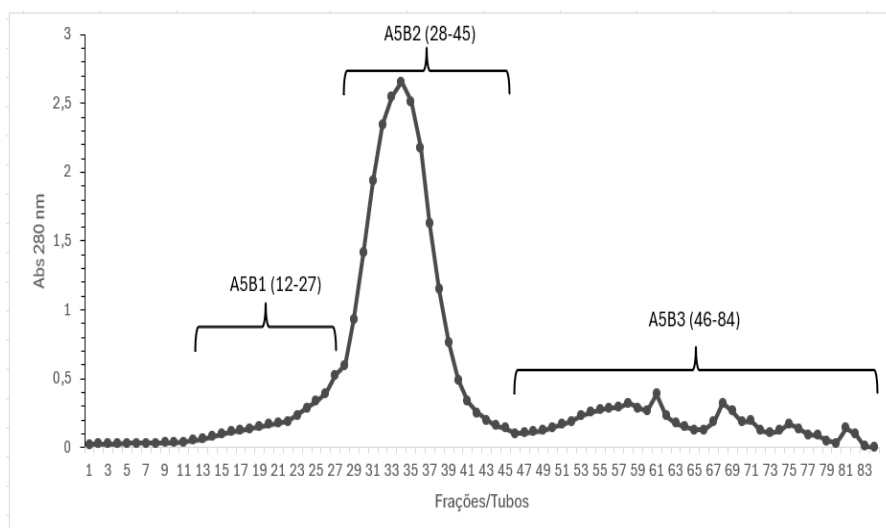
Previamente foram cultivadas amostras de *S. aureus* cepa ATCC (American Type Culture Collection) 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 9027 em Agar Trispticase Soja, à 37°C, por 24 horas, para obtenção de colônias isoladas. Um inóculo na escala 0,5 de McFarland (equivalendo a  $10^8$  Unidade Formadora de Colônia/mL) de cada microrganismo foi preparado em solução salina a 0,85% estéril.

Com auxílio de um swab estéril, cada inóculo dos microrganismos foi cultivado em placas contendo Agar Muller-Hinton, em seguida discos estéreis de 6mm de diâmetro foram embebidos na solução de toxina e dispostos equidistantes sob a placa. A incubação ocorreu à 35° por 18 horas. A interpretação de atividade antimicrobiana foi observada pela formação de um halo ao redor dos discos, indicando que ocorreu a inibição do crescimento do microrganismo (CLSI, 2020). Foram utilizados como controles positivos, discos de oxacilina (30µg), e Cefatazidima (30µg) e H<sub>2</sub>O como controle negativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Purificação de PLA<sub>2</sub>s de *B. alternatus*

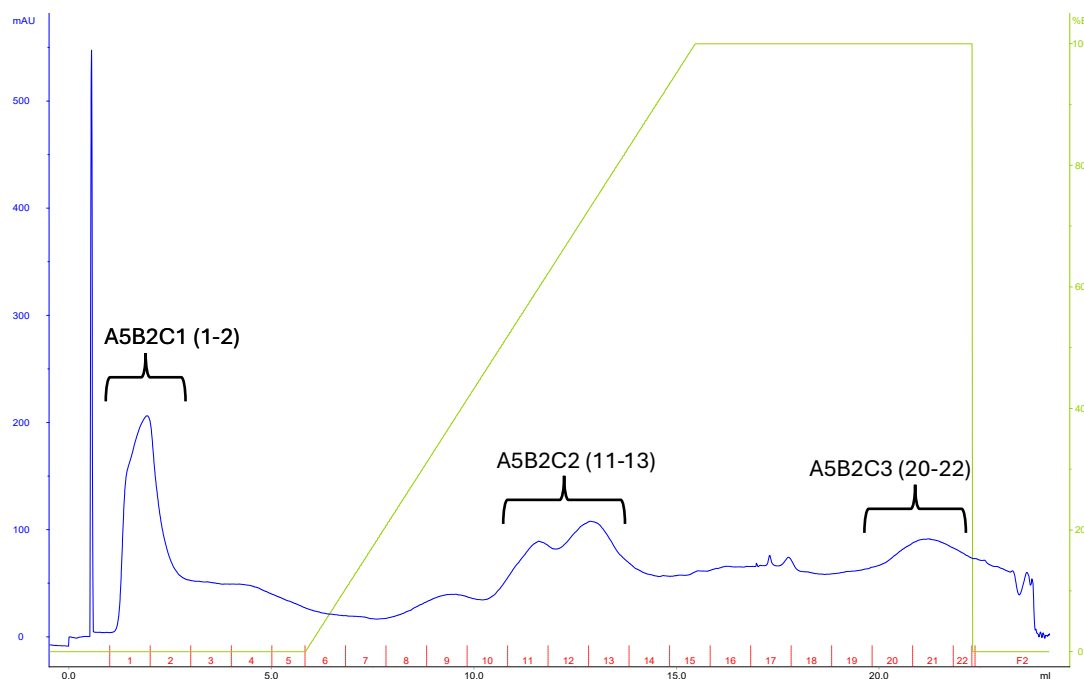
A cromatografia da fração A5 resultou em 3 subfrações principais, denominadas A5B1 a A5B3 (Figura 2).



**Figura 2 – Refinamento da fração A5 em cromatografia de exclusão molecular.**

A fração A5 (146 mg) foi aplicada em cromatografia de exclusão molecular (Sephadex-G75), eluída em AMBIC (0,05 M), a um fluxo de 20mL/hora e foram coletadas frações de 3 mL. As frações foram analisadas quanto à absorvância (Abs) em UV (280 nm), reunidas em 3 subfrações principais, denominados como A5B1 (12–27), A5B2 (28–45), A5B3 (46–84).

A análise do perfil de absorvância, monitorado em 280 nm da subfração A5B2 (2mg) submetida à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Phenyl HP permitiu a identificação de diferentes subfrações, denominadas A5B2C1, A5B2C2 e A5B2C3 (Figura 3).



**Figura 3 – Purificação de PLA<sub>2</sub> da peçonha de *B. alternatus* em cromatografia de interação hidrofóbica.**

A fração A5B2 (2 mg) foi aplicada em cromatografia de interação hidrofóbica (Phenyl HP), eluída em gradiente decrescente de NaCl (4 M – 0 M) diluído em Tris HCl (0,01 M, pH 8,5), a um fluxo de 0,5 mL/min e foram coletadas frações de 1mL. As frações foram analisadas quanto à absorbância (Abs) em UV (280 nm), reunidas em 3 subfrações principais, denominados como A5B2C1 (1-2); A5B2C2 (11-13); A5B2C3 (20-22).

Ao final das três etapas cromatográficas (DEAE-Sephacel, Sephadex G-75 e Phenyl HP) foi possível obter cerca de 1,4 mg de proteína isolada, o que corresponde a um rendimento proteico de 70% na última etapa cromatográfica.

Etapa Cromatográfica	Quantidade aplicada (mg)	Quantidade da proteína alvo (mg)	Aproveitamento (%)
DEAE-Sephacel	574 (PB)	213,1 (A5)	37,13
Sephadex G-75	160 (A5)	93,66 (A5B2)	58,54
Phenyl HP	2 (A5B2)	1,4 (A5B2C3)	70

**Tabela 1 – Relação entre valor das amostras aplicado e aproveitamento em cada etapa cromatográfica.**

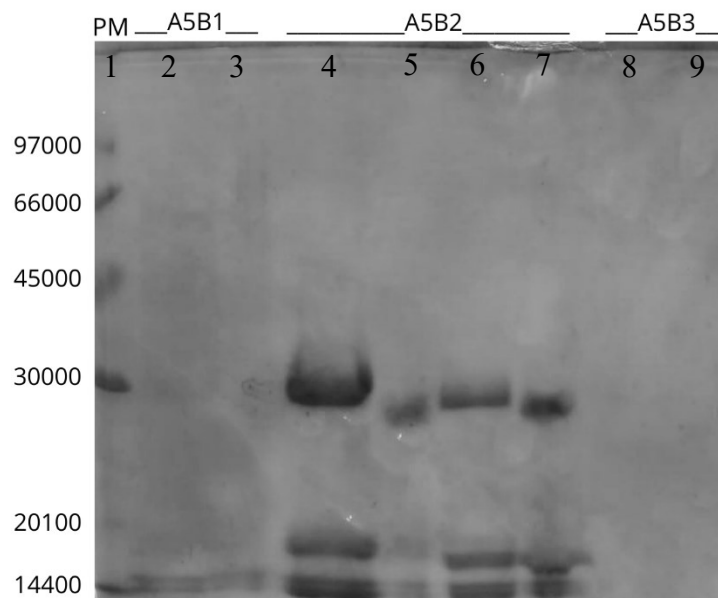
A tabela apresenta a quantidade de amostra aplicada em cada etapa cromatográfica (PB, A5, A5B2) e a quantidade de proteína alvo obtida (A5, A5B2, A5B2C3), juntamente com o seu respectivo percentual de aproveitamento.

## 4.2. Caracterização bioquímica e funcional

A análise das frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular permitiu identificar a presença de proteínas de diferentes massas moleculares (Fig. 4). Nas frações A5B1 e A5B3, não foi possível visualizar com clareza a formação de bandas que caracterizassem um perfil eletroforético definido. Em contrapartida, a fração A5B2 apresentou múltiplas bandas entre 14,4 e 30 kDa, indicando a presença de diversas

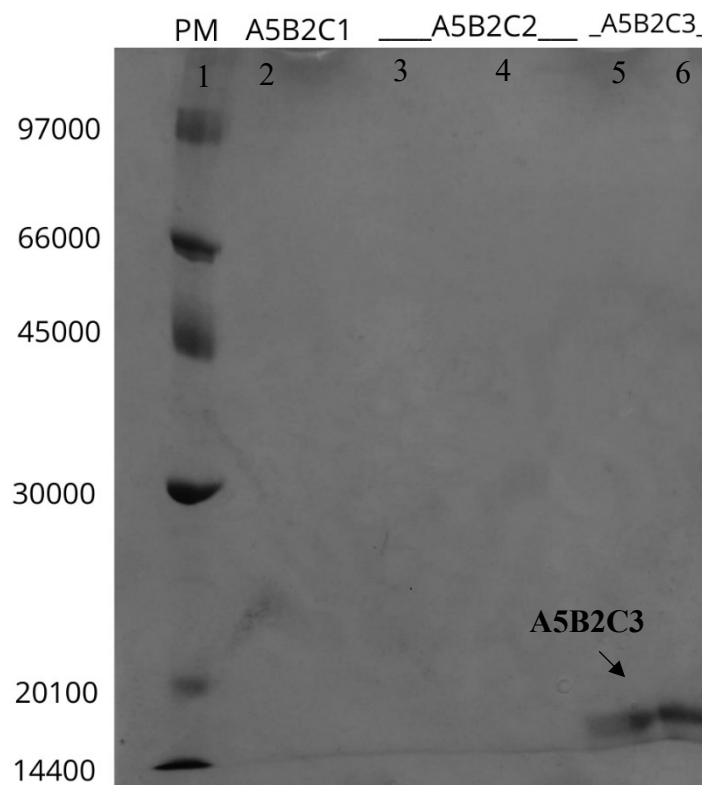
proteínas de médio e baixo peso molecular. A comparação entre os perfis obtidos com e sem agente redutor não evidenciou alterações significativas na migração dessas proteínas.

Das subfrações de A5B2 foi possível isolar uma proteína de massa molecular estimada em aproximadamente 17,2 kDa, com migração similar na presença ou ausência do agente redutor (Fig. 5).



**Figura 4 – Gel de eletroforese SDS-PAGE a 12% sob condições redutores e não redutoras, do perfil proteico de amostras resultantes do fracionamento da fração A5 da peçonha de *B. alternatus*.**

Linha 1: Padrão de massa molecular contendo fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa). Linhas 2–3: Subfração A5B1, sem e com agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol), respectivamente. Linhas 4–5: Subfração A5B2 (tubos 28–39), sem e com agente redutor. Linhas 6–7: Subfração A5B2 (tubos 40–45), sem e com agente redutor. Linhas 8–9: Subfração A5B3, sem e com agente redutor. Cada subfração foi aplicada na quantidade de 50  $\mu$ g.



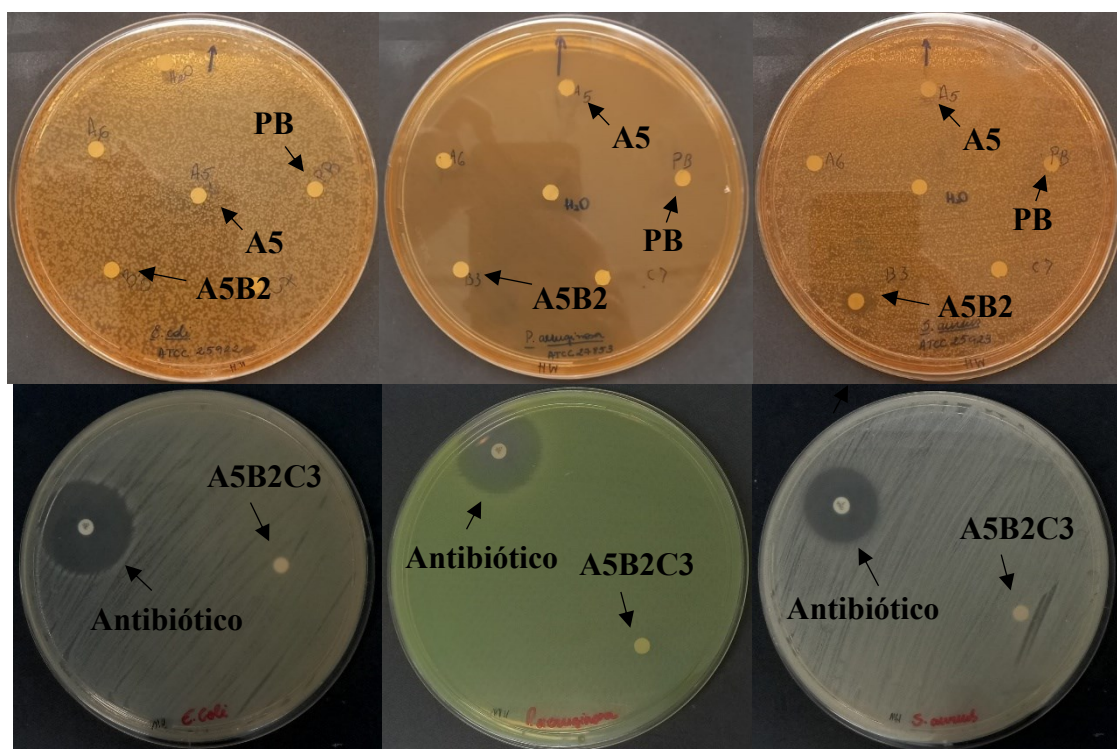
**Figura 5 – Gel de eletroforese SDS-PAGE a 14% sob condições redutoras e não redutoras, do perfil proteico de amostras resultantes do fracionamento das frações A5B2 da peçonha de *B. alternatus*.**

Linha 1: Padrão de massa molecular contendo fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa). Linhas 2: Subfração A5B2C1, sem agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol). Linhas 3–4: Subfração A5B2C2 sem e com agente redutor respectivamente. Linhas 5–6: Subfração A5B2C3 sem e com agente redutor. Cada subfração foi aplicada na quantidade de 50  $\mu$ g.

Em relação a atividade fosfolipásica, a peçonha bruta e as frações A5, A5B2 e A5B2C3 apresentaram halos translúcidos evidentes, confirmando atividade fosfolipásica, em contraste com o controle negativo (PBS), no qual não houve formação de halo (dados não mostrados).

A peçonha bruta e as frações com atividade fosfolipásica também foram analisadas quanto ao potencial antibacteriano contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Fig. 6). Dentre as amostras testadas apenas a subfração A5B2 demonstrou ação antimicrobiana, exclusivamente, frente à cepa de *S. aureus*, evidenciada pela formação de halo de inibição do crescimento. No entanto, a fosfolipase purificada (A5B2C3) não demonstrou atividade antibacteriana detectável frente as cepas testadas, uma vez que não foi observada formação de halo de inibição ao redor dos discos impregnados com a amostra. Nenhuma das amostras testadas, tampouco a peçonha bruta apresentou atividade detectável contra as cepas *E. coli* ou *P. aeruginosa*, comparado com o controle ( $H_2O$ ). Por outro lado, os discos contendo os antibióticos de referência utilizados como controle

positivo, ceftazidima para *E. coli* e *P. aeruginosa*, e oxacilina para *S. aureus*, apresentaram halos evidentes, confirmando a viabilidade do ensaio (Fig. 6).



**Figura 6 – Avaliação da atividade antibacteriana.** Foram testadas as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 (esquerda), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (centro) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (direita), cultivadas em meio Agar Müller-Hinton. Os discos de papel foram embebidos com as amostras de peçonha bruta de *B. alternatus* (PB), frações A5, A5B2, fosfolipase purificada (A5B2C3), antibióticos de referência (controle<sup>+</sup>) e H<sub>2</sub>O (controle<sup>-</sup>), incubados a 35 °C por 18 horas.

## 5. DISCUSSÃO

Em três etapas cromatográficas obteve-se a purificação de uma enzima fosfolipásica com massa molecular aproximada de 17 KDa, com aproveitamento de 70% na última cromatografia. O perfil bioquímico dessa toxina é compatível com a BaltPLA<sub>2</sub>, previamente isolada e caracterizada por Dias e colaboradores (2018 e 2023). Além disso, foi identificada uma fração proteica com atividade antibacteriana contra *S. aureus*, evidenciando o potencial da peçonha como fonte de moléculas com ação antimicrobiana.

A purificação da toxina foi realizada em três etapas cromatográficas (troca aniônica, exclusão molecular e interação hidrofóbica), com aproveitamento de 70% na última cromatografia. Esse valor se mostrou superior ao relatado por Dias e col. (2018) na purificação da BaltPLA<sub>2</sub>. Essa toxina foi isolada com duas etapas cromatográficas, semelhantes aquelas utilizadas em nosso trabalho (troca aniônica e interação hidrofóbica),

mas a última cromatografia apresentou rendimento de apenas 2,5% em relação ao valor aplicado na coluna (60 mg), resultando em 1,5 mg de BaltPLA<sub>2</sub>. Comparando com nossos resultados, acreditamos que a utilização de uma coluna pré-empacotada em um sistema automatizado de cromatografia líquida pode ter contribuído para a eficiência do processo cromatográfico, aumentando o rendimento final e a recuperação da proteína purificada, apesar da inserção de uma etapa adicional.

Com relação ao perfil de migração eletroforética, a toxina isolada apresentou massa molecular estimada de 17 kDa, tanto na presença quanto na ausência de agente redutor. Além disso, manteve atividade fosfolipásica característica, confirmando a preservação de sua função enzimática após o processo de purificação. Esses resultados são compatíveis com os descritos para a BaltPLA<sub>2</sub> por Dias e col. (2018), reforçando a similaridade entre a proteína isolada e aquela previamente caracterizada. Essa faixa de massa molecular é típica das fosfolipases A<sub>2</sub> de peçonhas de serpentes, enzimas de baixo peso molecular que geralmente apresentam estrutura estável (Schaloske; Dennis, 2006).

Mesmo com atividade enzimática preservada, a toxina isolada não apresentou efeito antibacteriano. No entanto, a fração A5B2, que deu origem a fosfolipase, demonstrou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Esse resultado sugere que a atividade antimicrobiana verificada na fração intermediária pode estar associada à presença de outros componentes da peçonha ou depende de um fator sinérgico entre a enzima isolada e outros componentes. Evidências semelhantes foram descritas por Bustillo e col. (2015), que demonstraram um efeito sinérgico entre uma PLA<sub>2</sub> isolada não tóxica e uma metaloprotease hemorrágica de *B. alternatus*. Já Stabeli (2004) identificou atividade bactericida contra *S. aureus* e *E. coli* em uma LAAO isolada da peçonha de *B. alternatus*.

Embora a fosfolipase isolada neste estudo não tenha apresentado atividade antibacteriana contra as cepas testadas, é importante ressaltar que seu potencial antimicrobiano não pode ser descartado. A toxina pode apresentar especificidade quanto a determinados microrganismos e/ou efeitos sinérgicos com outros componentes da peçonha também podem influenciar sua atividade biológica. Diversos estudos relatam efeitos antimicrobianos de toxinas presentes em peçonhas de serpentes, incluindo fosfolipases A<sub>2</sub> e L-aminoácido oxidases (PLA<sub>2</sub> e LAAOs), evidenciando que determinados componentes ofídicos podem exercer atividade seletiva contra microrganismos patogênicos (Stabeli, 2004; Corrêa, 2016; Samy, 2014).

Portanto, a caracterização da fosfolipase isolada e da fração antibacteriana requer análises complementares, incluindo testes contra um espectro mais amplo de patógenos, avaliação de mecanismos de ação e ensaios de sinergia entre diferentes componentes da peçonha. Mesmo que a toxina isolada não tenha apresentado atividade antibacteriana, o efeito evidenciado em frações intermediárias reforça a relevância da investigação do potencial antimicrobiano de diferentes componentes da peçonha. Esses achados contribuem para ampliar o conhecimento sobre o repertório bioativo da peçonha de *B. alternatus* e fornecem subsídios para estudos futuros voltados à caracterização molecular das toxinas envolvidas, à elucidação de mecanismos de sinergismo e à exploração de possíveis aplicações terapêuticas dessas moléculas.

## 6. CONCLUSÃO

Os métodos de purificação aplicados neste estudo permitiram isolar, com grau de pureza e rendimento proteico consideráveis, uma enzima fosfolipásica da peçonha de *B. alternatus*. Apesar da manutenção da atividade enzimática, a proteína isolada não apresentou efeito antibacteriano. Em contrapartida, a fração intermediária A5B2 exibiu atividade contra *S. aureus*, sugerindo que o potencial antimicrobiano esteja relacionado a outros componentes da peçonha ou a uma possível ação sinérgica com a fosfolipase purificada. Mais estudos são necessários para caracterizar o potencial antimicrobiano de componentes da peçonha de *B. alternatus*, bem como identificar qual toxina foi responsável pelo efeito ou se ele decorreu de sinergia entre diferentes componentes. Entretanto, nossos resultados destacam a relevância do estudo de toxinas ofídicas e fornecem bases para futuras pesquisas. Nosso estudo confirma a capacidade de obtenção de uma proteína isolada a partir da peçonha bruta e contribui para a compreensão do potencial biológico dessas toxinas e aplicação em estudos farmacológicos e antimicrobianos.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALAOUI MDARHRI, H *et al.* Alternatives therapeutic approaches to conventional antibiotics: advantages, limitations and potential application in medicine. *Antibiotics*, Basel, v. 11, n. 12, p. 1826, dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121826>.
- ALTERTHUM, F.; RÁCZ, M. L. *Microbiologia-Trabulsi Alterthum* 6a Ed.-Ebook. 2015.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A2: a structural review. *Toxicon*, v. 34, n. 8, p. 827–841, ago. 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00036-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00036-0).

ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

BUSTILLO, S. et al. Phospholipase A2 enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. *Chemico-Biological Interactions*, v. 240, p. 30-36, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.08.002>

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. *The Venomous Reptiles of Latin America*. London: Comstock, 6th ed., 425p, 1989.

CAMPOS, L. B.; PUCCA, M. B.; RONCOLATO, E. C.; BERTOLINI, T. B.; NETTO, J. C.; BARBOSA, J. E. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian *Bothrops* spp. venoms. *Toxicon*, v. 76, p. 1–10, 15 dez. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.063>.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90116-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90116-9).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. Wayne, PA: CLSI, 2020. (CLSI supplement M100).

CORRÊA, E. A. et al. Isolation, structural and functional characterization of a new Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi* urutu with bactericidal potential. *Toxicon*, v. 115, p. 13–21, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.02.021>.

COSTA, C. B. Venenos de serpentes do gênero *Bothrops*: impacto da glicosilação na complexidade dos proteomas e função de toxinas. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022. Defesa em: 30 mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.11606/T.46.2022.tde-06092022-123853>.

COSTA, T. R.; MENGALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides*, v. 29, n. 10, p. 1645–1656, Oct. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.05.021>

DIAS, Edigar H. V. et al. BaltPLA2: a new phospholipase A2 from *Bothrops alternatus* snake venom with antiplatelet aggregation activity. *Protein & Peptide Letters*, v. 25, n. 10, p. 943–952, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929866525666181004101622>.

DIAS, Edigar Henrique Vaz et al. Effect of BaltPLA<sub>2</sub>, a phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops alternatus* snake venom, on the viability of cells infected with dengue virus. *Toxicology in Vitro*, v. 88, art. 105562, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105562>.

FUNAGOSHI, Stephanie Akemi. Identificação e separação de fosfolipases da peçonha de *Bothrops alternatus* com potencial antiparasitário e antitumoral. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2024.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

LAYNE, Ennis. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, v. 6, n. 14, p. 447–454, 1957. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(57\)03413-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(57)03413-8)

LEANDRO, L. F.; MENDES, C. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; ALMEIDA, R. de; MARTINS, C. H. G. Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A<sub>2</sub> of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 87, n. 1, p. 143–149, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520130511>

LEITE, Renner de Souza. Atividade fosfolipásica de toxinas. In: SELISTRE-DE-ARAÚJO, Heloisa Sobreiro; SOUZA, Dulce Helena Ferreira de (Org.). Métodos em toxinologia: toxinas de serpentes. São Carlos: EdUFSCar, 2007. p. 53-55.

MAYER, C. et al. Bacteria's different ways to recycle their own cell wall. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 309, n. 7, p. 151326, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.06.006>.

MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *bothrops* snakes. *Toxicon*, v. 29, n. 6, p. 713-723, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90063-W](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90063-W).

NISENBOM, H.E.; PERAZZO, J.C.; MONSERRAT, A.J.; VIDAL, J.C. Contribution of Phospholipase A<sub>2</sub> to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. *Toxicon*, v. 24, n. 8, p. 807-817, 1986. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90106-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90106-6).

OHLER, M.; GEORGIEVA, D.; SEIFERT, J. et al. The venomics of *bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. *Jornal of Proteome Research*, 9:2422 – 2437, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/pr901128x>.

ROCHA, M. M. T. da; FURTADO, M. F. D. de. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no

Brasil (Serpentes, Viperidae). Revista Brasileira de Zoologia, v. 22, n. 2, p. 383-393, jun. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-81752005000200012>.

SALTON M.R.J. Studies of the bacterial cell wall. IV. The composition of the cell walls of some Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Biochim. et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 10, n.4, p.512-523, 1953. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90296-0](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90296-0).

SAMY, R. P.; KANDASAMY, M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. Wound healing activity and mechanisms of action of an antibacterial protein from the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). PLoS ONE, v. 9, n. 2, p. e80199, 14 fev. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080199>.

SANTOS, A. A. A.; OLIVEIRA, T. de M. N.; GOMES, V. H. P.; NASCIMENTO, M. do C. L. Utilização de toxinas ofídicas como mecanismos farmacológicos. Revista Multidisciplinar em Saúde, v. 4, n. 4, p. 11–19, out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.51161/integrar/remis/3847>

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2006.07.011>.

SERRANO, S.M.T.; SAMPAIO, C.A.M.; MANDELBAUM, F.R. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom – II. Isolation of the metalloproteinases MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP1 and MSP2. Toxicon, v. 31, n. 4, p. 483-492, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90183-J](https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90183-J).

SILVA, L. M. et al. Surto de colonização/infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em UTI de pacientes com COVID-19: descrição de casos e medidas adotadas. \*Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 25, n. S1, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.101369>.

STABELI R. G; MARCUSSI, S; CARLOS, G. B; PIETRO, R. C; SELISTRE DEARAUJO, H. S; GIGLIO, J. R; OLIVEIRA, E. B. & SOARES, A. M. (2004) Platelet aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. Bioorg Med Chem 12(11):2881-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.049>.

STROHL WR. 2000. The role of natural products in a modern drug discovery program. Drug Disc Today 5: 39-41. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(99\)01443-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(99)01443-9).

Tasoulis, T.; Isbister, G.K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. Toxins 2017, 9, 290. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>.

VALARIO, Isabella de Moraes; PAPA, Luciene Patrici. Biotechnological potential of Brazilian snake venom in the production of biologically active drugs: Literature review. *International Seven Journal of Health Research*, v. 3, n. 4, p. 014, 2024. DOI: <https://doi.org/10.56238/isevjhv3n4-014>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Antimicrobial Resistance.2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022. 2022.